

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
29. September 2005 (29.09.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2005/089797 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 39/395**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/002185

(22) Internationales Anmeldedatum:  
2. März 2005 (02.03.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
10 2004 011 776.4 9. März 2004 (09.03.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **LTS LOHMANN THERAPIE-SYSTEME AG** [DE/DE]; Lohmannstrasse 2, 56626 Andernach (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BALTHASAR, Sabine** [DE/DE]; Feldbergstrasse 17, 65779 Kelkheim (DE). **VON BRIESEN, Hagen** [DE/DE]; Langgasse 4, 65510 Hünstetten (DE). **DINAUER, Norbert** [DE/DE]; Cordierstrasse 48, 60262 Frankfurt (DE). **KREUTER, Jörg** [DE/DE]; Georg-August-Zinn-Strasse 13, 61350 Bad Homburg (DE). **LANGER, Klaus** [DE/DE]; An der Turnhalle 5, 61137 Schöneck (DE). **WARTLICK, Heidrun** [DE/DE]; Lindenstrasse 39, 60325 Frankfurt (DE).

(74) Anwalt: **FLACCUS, Rolf-Dieter**; Bussardweg 10, 50389 Wesseling (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,

PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Erklärungen gemäß Regel 4.17:**

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

**Veröffentlicht:**

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: SUPPORT SYSTEM IN THE FORM OF PROTEIN-BASED NANOPARTICLES FOR THE CELL-SPECIFIC ENRICHMENT OF PHARMACEUTICALLY ACTIVE SUBSTANCES

(54) Bezeichnung: TRÄGERSYSTEM IN FORM VON NANOPARTIKELN AUF PROTEINBASIS ZUR ZELLSPEZIFISCHEN ANREICHERUNG VON PHARMAZEUTISCH AKTIVEN WIRTSSTOFFEN

(57) Abstract: The invention relates to a support system in the form of protein-based nanoparticles for the cell-specific, intracellular enrichment of at least one pharmacologically active substance, which has structures that are coupled by means of reactive groups. Said structures enable a cell-specific attachment and cellular absorption of the nanoparticles. The invention also relates to a method for producing said system.

(57) Zusammenfassung: Trägersystem in Form von Nanopartikeln auf Proteinbasis zur zellspezifischen, intrazellulären Anreicherung zumindest eines pharmakologisch aktiven Wirkstoffs, das über reaktive Gruppen gekoppelte Strukturen aufweist, die eine zellspezifische Anlagerung und zelluläre Aufnahme der Nanopartikel ermöglichen sowie Verfahren zu seiner Herstellung.



WO 2005/089797 A2

Trägersystem in Form von Nanopartikeln auf Proteinbasis zur  
zellspezifischen Anreicherung von pharmazeutisch aktiven  
Wirkstoffen

5

Gegenstand der Erfindung ist ein Trägersystem für  
pharmazeutisch aktive Wirkstoffe, das zur zellspezifischen  
Anreicherung der pharmazeutisch aktiven Wirkstoffe geeignet  
ist und in Form von Avidin-modifizierten Nanopartikeln auf  
10 Proteinbasis, vorzugsweise auf Basis von Gelatine und/oder  
Serumalbumin, insbesondere humanem Serumalbumin (HSA),  
vorliegt, an die biotinylierte Antikörper durch Ausbildung  
eines stabilen Avidin-Biotin-Komplexes gebunden sind und  
bei denen eine zusätzliche Bindung von pharmazeutisch  
15 aktiven Wirkstoffen sowohl kovalent oder komplexierend über  
das Avidin-Biotin-System als auch inkorporativ oder  
adsorptiv erfolgen kann.

Nanopartikel sind Partikel einer Größe zwischen 10 und  
20 1000 nm aus künstlichen oder natürlichen makromolekularen  
Substanzen, an die Arzneistoffe oder anderes biologisch  
aktives Material kovalent, ionisch oder adsorptiv gebunden  
oder in die dieses Material inkorporiert sein kann.

In EP 1 392 255 werden Nanopartikel auf Basis von humanem  
25 Serumalbumin offenbart, an die zur Überwindung der Blut-  
Hirn-Schranke kovalent oder über ein Avidin/Biotin-System  
Apolipoprotein E gekoppelt ist.

Ein besonderes Ziel einer Pharmakotherapie ist jedoch nicht  
30 nur die spezifische Anreicherung eines pharmakologisch ak-  
tiven Wirkstoffs bzw. therapeutisch wirksamen Arzneistoffs

in einem bestimmten Gewebe oder Organ zu erreichen, wie in EP 1 392 255 offenbart, sondern darüber hinaus sogar in spezifischen Zellen.

5 Unmodifizierte Nanopartikel ermöglichen ein passives „Drug Targeting“, das dadurch gekennzeichnet ist, dass die Partikel nach intravasaler Applikation durch Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) aufgenommen werden. Eine Anreicherung derartiger Nanopartikel wurde in Makrophagen  
10 der Leber, der Milz, des Knochenmarks sowie in zirkulierenden Monozyten beobachtet. Von dem passiven „Drug Targeting“ wird das aktive „Drug Targeting“ unterschieden, bei dem der Wirkstoff gezielt mit Hilfe von modifizierten Nanopartikeln auch in primär nicht zugänglichen Körper-  
15 kompartimenten oder Zellsystemen angereichert werden soll. Hierzu ist es erforderlich, Nanopartikel mit hydrophilen Oberflächenstrukturen zu verwenden, die unspezifische Wechselwirkungen mit Nicht-Zielzellen minimieren, und diese mit Liganden auszustatten, die eine zellspezifische  
20 Anreicherung der Nanopartikel ermöglichen. Solche Liganden werden auch als „Drug Targeting-Liganden“ bezeichnet. Der Einsatz zellspezifischer Nanopartikel als Träger für Arzneistoffe ermöglicht es, einen pharmakologisch aktiven Wirkstoff unter kontrollierten Bedingungen in Zielzellen  
25 anzureichern oder gezielt an seinen Wirkort im Körper zu bringen. Die meisten Arzneistoffe erfüllen ohne geeignete Arzneiform dieses Ziel nicht und zeigen allenfalls eine zelluläre Anreicherung oder Körperverteilung, die durch die physiko-chemischen Eigenschaften des Wirkstoffs selbst  
30 bedingt ist. Nur ein Teil des applizierten Arzneistoffs erreicht den gewünschten Zielort, wohingegen der

verbleibende Teil für unerwünschte Nebenwirkungen oder toxische Effekte verantwortlich ist. Zellspezifische Nanopartikel tragen somit dazu bei, dass unerwünschte Nebenwirkungen und toxische Eigenschaften von Wirkstoffen reduziert werden können.

In ersten Untersuchungen wurden hydrophile Latexpartikel verwendet, die durch Copolymerisation von Hydroxyethylmethacrylat, Methacrylsäure und Methylmethacrylat hergestellt wurden. An diese Partikel wurde ein Antikörper gegen  $\gamma$ -Globulin des Kaninchens gebunden. Im Vergleich zu unmodifizierten Partikeln konnte eine Bindung der Antikörper-modifizierten Zubereitung an Lymphozyten beobachtet werden, die mit einem aus dem Kaninchen gewonnenen Antiserum gegen diese Lymphozyten vorinkubiert wurden.

Nachfolgend wurden entsprechende Partikelsysteme auf Basis von Polyacrylaten mit zusätzlich eingebundenem Eisenoxid verwendet, um eine magnetische Separation von Lymphozyten und Erythrozyten durchzuführen.

Basierend auf diesen grundlegenden Arbeiten wurden dann monoklonale anti-CD3 Antikörper über eine C7-Spacerstruktur an Polyacrylat-Nanopartikel gebunden und diese unter Zellkulturbedingungen untersucht. Problematisch bei diesen Arbeiten war allerdings die Tatsache, dass die Zuordnung der Zellen zu den Subpopulationen und damit die beobachtete Partikelassoziation mit der entsprechenden Subpopulation

rein visuell im Mikroskop vorgenommen wurde und somit nicht zweifelsfrei erfolgen konnte.

Auch die adsorptive Bindung von monoklonalen Antikörpern an die Oberfläche von Polyhexylcyanoacrylat-Nanopartikel wurde untersucht. Einerseits konnte dabei eine effektive Adsorption der Antikörper an die Partikeloberfläche beobachtet werden, andererseits führte die Zugabe von weiteren Serumbestandteilen zu einer kompetitiven Verdrängung der Antikörper von der Partikeloberfläche. Insofern ist eine adsorptive Bindung von Liganden für ein zellspezifisches „Drug Targeting“ in biologischen Systemen nicht geeignet.

Ein weiterer Nachteil der beschriebenen zellspezifischen Nanopartikel-Systeme ist darin zu sehen, dass sie auf nicht biologisch abbaubaren Polymermaterialien wie Latex und Polyacrylaten basieren.

Erste Untersuchungen zur proteinochemischen Bindung von Antikörpern an die Oberfläche von Nanopartikeln auf der Basis von Serumalbumin wurden gemacht. Dabei wurde eine Konjugation der Antikörper über die primären Aminogruppen des Albumins und der Antikörper unter Anwendung der Glutaraldehyd-Reaktion vorgenommen. Als Liganden wurden monoklonale Antikörper gegen das Lewis-Lungenkarzinom sowie vergleichend unspezifische IgG-Antikörper eingesetzt. Obwohl der freie spezifische Antikörper sowohl unter Zellkulturbedingungen als auch nach intravenöser Applikation am Versuchstier eine deutliche Anreicherung in den Zielzellen gezeigt hat, wurde nach Konjugation mit den

Nanopartikeln unter *in vivo*-Bedingungen lediglich eine sehr geringe Anreicherung der Partikel im Tumor detektiert. Der Hauptanteil der applizierten Nanopartikel wurde in der Leber und den Nieren gefunden. Nanopartikel, die mit dem unspezifischen IgG-Antikörper konjugiert waren, zeigten keinerlei Anreicherung im Tumorgewebe. Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte somit nur eine geringe Spezifität der konjugierten Nanopartikel auf Basis von humanem Serumalbumin erzielt werden. Der Hauptteil dieses Partikelsystems zeigte die für ein passives „Drug Targeting“ typische, unspezifische Körperverteilung. Da die verwendeten konjugierten Nanopartikel im Hinblick auf die Bindung der Antikörper jedoch nur unzureichend charakterisiert waren, bleibt unklar, ob die mangelnde Spezifität durch eine unzureichende Antikörper-Bindung bedingt war. Jedenfalls wurde ein Nachweis von spezifischer und rezeptorvermittelter Aufnahme von Nanopartikeln in Zielzellen bei gleichzeitiger Umgehung von Nichtzielzellen bisher jedoch nicht erbracht.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, Nanopartikel bereitzustellen, die die Nachteile der beschriebenen Nanopartikel-Systeme nicht aufweisen, sondern eine hohe Zellspezifität auch bei Verwendung in biologischen Systemen aufweisen, um pharmakologisch aktive Wirkstoffe spezifisch in ausgewählten Zielzellen anzureichern zu können, und die auf einem biologisch abbaubaren Material basieren.

Die Aufgabe wird überraschenderweise durch ein Trägersystem in Form von Avidin-modifizierten Nanopartikeln auf Proteinbasis gelöst, an die biotinylierte Antikörper durch

Ausbildung eines stabilen Avidin-Biotin-Komplexes gebunden sind. Als Proteine werden vorzugsweise Gelatine und/oder Serumalbumin, besonders bevorzugt humanes Serumalbumin verwendet. Bei diesen modifizierten Nanopartikeln kann eine  
5 zusätzliche Bindung von pharmakologisch aktiven Wirkstoffen an die Nanopartikel sowohl kovalent, komplexierend über das Avidin-Biotin-System als auch inkorporativ oder adsorptiv erfolgen.

10 Figur 1 zeigt die Struktur eines Avidin-modifizierten Nanopartikels auf Basis von Gelatine oder HSA, mit über Avidin-Biotin-Komplex gebundenem Antikörper.

Figur 2 ist ein Säulendiagramm, das die zelluläre Aufnahme  
15 von Antikörper (Trastuzumab)-modifizierten Gelatine A-Nanopartikeln in verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien, ermittelt durch FACS-Analyse, zeigt. Die Antikörper-modifizierten Nanopartikel wurden jeweils mit den nicht modifizierten Nanopartikeln unter gleichen Inkubations-  
20 bedingungen verglichen. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle.

Zur Präparation von Nanopartikeln gemäß der Erfindung wurde eine wässrige Gelatine-Lösung durch einen doppelten  
25 Desolvatationsprozess zu Nanopartikeln umgesetzt und diese anschließend durch Quervernetzung stabilisiert. Die auf der Oberfläche dieser Nanopartikel befindlichen funktionellen Gruppen (Aminogruppen, Carboxylgruppen, Hydroxylgruppen) können durch geeignete Reagenzien zu reaktiven Thiolgruppen  
30 umgesetzt werden. Funktionelle Proteine können über bifunktionale Spacermoleküle, die eine Reaktivität sowohl

gegenüber Aminogruppen als auch freien Thiolgruppen aufweisen, an diese Thiolgruppen-modifizierten Nanopartikel gebunden werden. Zu diesen funktionellen Proteinen zählen insbesondere Avidinderivate oder zellspezifische Antikörper.

Bei der Präparation der Nanopartikel für die nachfolgend beschriebenen Zellkulturversuche wurde eine Reaktion der primären Aminogruppen auf der Partikeloberfläche mit 2-Iminothiolan durchgeführt, die zu einer Einführung von freien Thiolgruppen auf der Partikeloberfläche führte. Die Aminogruppen des Avidin-Derivates NeutrAvidin™ wurden mit dem bifunktionalen Spacer Sulfo-MBS (m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimidester) aktiviert und nach säulen-chromatographischer Aufreinigung dieser Aktivierungs-zwischenstufe mit den thiolierten Gelatine-Nanopartikeln versetzt. Dieses Zwischenprodukt der Avidin-modifizierten Nanopartikel stellt ein universelles Trägersystem für eine Vielzahl biotinylierter Substanzen dar, die über die Avidin-Biotin-Komplexbildung gebunden werden können.

Zur Bindung der Antikörper, vorzugsweise monoklonaler Antikörper, wurden die Antikörper entweder biotinyliert erworben oder durch Umsetzung mit NHS-Biotin (N-Hydroxysuccinimidobiotin) biotinyliert und mit den Avidin-modifizierten Nanopartikeln versetzt. Durch die beschriebene Avidin-Biotin-Komplexbildung wurden dadurch Antikörper-modifizierte Nanopartikel auf der Basis von Gelatine erhalten (Figur 1). Entsprechende Antikörper-modifizierte Nanopartikel können aber auch auf Basis von



Serumalbumin, vorzugsweise humanem Serumalbumin, hergestellt werden.

Die vorliegende Erfindung umfasst somit ein Trägersystem  
5 zur zellspezifischen, intrazellulären Anreicherung  
zumindest eines pharmakologisch aktiven Wirkstoffs, das in  
Form von Nanopartikeln auf Proteinbasis vorliegt und über  
reaktive Gruppen gekoppelte Strukturen aufweist, die eine  
zellspezifische Anlagerung und zelluläre Aufnahme der  
10 Nanopartikel ermöglichen. Als Proteinbasis kommen  
vorzugsweise Gelatine und/oder Serumalbumin, besonders  
bevorzugt humanes Serumalbumin, in Betracht. Die reaktive  
Gruppe ist vorzugsweise eine Amino- Thiol-, Carboxylgruppe  
oder ein Avidin-Derivat und die gekoppelte Struktur ein  
15 Antikörper, besonders bevorzugt ein monoklonaler  
Antikörper.

Die Erfindung umfasst auch ein entsprechendes Trägersystem,  
das zusätzlich zumindest einen pharmazeutisch aktiven  
20 Wirkstoff enthält, der durch Adsorption, Inkorporation oder  
kovalente oder komplexierende Bindung über die reaktiven  
Gruppen an das Trägersystem bzw. die Nanopartikel gebunden  
ist.

25 Die Erfindung umfasst auch die Verwendung eines  
erfindungsgemäßen Trägersystems zur Herstellung eines  
Arzneimittels für die Anreicherung eines pharmazeutisch  
aktiven Wirkstoffs an oder in spezifischen Zellen.

30 Die Erfindung umfasst ferner ein Verfahren zur Herstellung  
eines Trägersystems in Form von Nanopartikeln auf  
Proteinbasis zur zellspezifischen Anreicherung zumindest

eines pharmakologisch aktiven Wirkstoffs, das die folgenden Schritte umfasst:

- Desolvatieren einer wässrigen Protein-Lösung,
- Stabilisieren der durch Desolvatation entstandenen Nanopartikel durch Quervernetzung,
- Umsetzen eines Teils der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der stabilisierten Nanopartikel zu reaktiven Thiol-Gruppen,
- kovalentes Anheften funktioneller Proteine, vorzugsweise von Avidin, mittels bifunktionaler Spacermoleküle,
- gegebenenfalls Biotinylierung des Antikörpers,
- Beladen der Avidin-modifizierten Nanopartikel mit biotinyliertem Antikörper,
- Beladen der Avidin-modifizierten Nanopartikel mit biotinyliertem und pharmazeutisch oder biologisch aktiven Wirkstoff.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird besonders die Verwendung von Gelatine und/oder Serumalbumin, insbesondere Serumalbumin humanen Ursprungs bevorzugt.

Vorzugsweise erfolgt das Desolvatieren durch Rühren und Zugabe eines wassermischbaren Nichtlösungsmittels für Proteine oder durch Aussalzen. Das wassermischbare Nichtlösungsmittel für Proteine wird vorzugsweise aus der Gruppe ausgewählt, die Ethanol, Methanol, Isopropanol, und Aceton umfasst.

Zum Stabilisieren der Nanopartikel werden vorzugsweise thermische Prozesse oder bifunktionale Aldehyde, insbesondere Glutaraldehyd, oder Formaldehyd verwendet.

Bevorzugt wird als Thiolgruppen-modifizierendes Agens eine Substanz verwendet, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die

2-Iminothiolan, eine Kombination aus 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und Cystein oder eine Kombination aus 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und Cystaminiumdichlorid sowie Dithiotreitol umfasst.

5 Als bifunktionales Spacermolekül wird vorzugsweise eine Substanz verwendet, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfo-succinimidester, Sulfosuccinimidyl-4-[N-maleimido-methyl]cyclohexan-1-carboxylat, Sulfosuccinimidyl-2-[m-azido-o-nitrobenzamido]-ethyl-1,3'-dithiopropionat, Dimethyl-3,3'-dithiobispropionimidat-dihydrochlorid und 3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimidylpropionat] umfasst.

#### 15 Beispiel:

Zur Herstellung von Protein-Nanopartikeln wurden 500 mg Gelatine A in 10,0 ml gereinigtem Wasser unter Erwärmen gelöst und durch Zugabe von 10,0 ml Aceton zu einem Sediment ausgefällt. Die ausgefällte Gelatine wurde 20 abgetrennt, erneut unter Erwärmen in 10,0 ml Wasser gelöst und der pH-Wert der Lösung auf pH 2,5 eingestellt.

Nanopartikel wurden aus dieser Lösung durch tropfenweise Zugabe von 30 ml Aceton erhalten (Desolvatations-Prozeß). Die Nanopartikel wurden durch Zugabe von 625 µl

25 Glutaraldehyd 8 % und Rühren über Nacht stabilisiert. Die Nanopartikel wurden in Aliquoten zu 2,0 ml durch 5 Zyklen Zentrifugation und Redispergieren mittels Ultraschallbehandlung aufgereinigt. Zur Thiolierung der Partikeloberfläche wurden 1,0 ml Nanopartikel-Suspension (20 mg/ml) mit 30 2,5 ml einer Lösung von 30 mg 2-Iminothiolan (Traut's Reagenz) in Tris-Puffer pH 8,5 versetzt und über 24 h gerührt. Die Aufreinigung nach Thiolierung wurde wie oben beschrieben erneut ausgeführt.

Das Avidin-Derivat FITC-NeutrAvidin™ wurde über den bifunktionalen Spacer Sulfo-MBS (m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimidester) mit den thiolierten Nanopartikeln verbunden. Zur Aktivierung des Avidin-Derivates wurde eine Lösung von 2,5 mg FITC-NeutrAvidin™ in 500 µl PBS-Puffer pH 7,0 mit 0,75 mg Sulfo-MBS versetzt und über 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Abtrennung von nicht abreagiertem Sulfo-MBS von dem aktivierten NeutrAvidin™ wurde über eine Größenausschlußchromatographie durchgeführt. Die Fraktionen, in denen bei einer spektrophotometrischen Detektion bei 280 nm NeutrAvidin™ nachgewiesen werden konnte, wurden vereinigt, mit der Suspension der thiolierten Nanopartikel versetzt und über 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Eine weitere Aufreinigung der nunmehr kovalent FITC-NeutrAvidin™-modifizierten Nanopartikel wurde wie oben beschrieben ausgeführt. Die erhaltenen Überstände der Partikelreinigung wurden photometrisch im Hinblick auf ungebundenes NeutrAvidin™ untersucht und der Anteil an kovalent gebundenem NeutrAvidin™ daraus berechnet. Die Funktionalität des gebundenen NeutrAvidin™, ausgedrückt als Anzahl der Biotin-Bindungsstellen pro Avidin-Molekül, wurde durch ein Titrationsexperiment mit Biotin-4-Fluorescein ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass 2,4 der 4 im Avidin-Molekül theoretisch vorhandenen Biotin-Bindungsstellen auch nach der Konjugation mit den Nanopartikeln funktional zur Verfügung stehen. Für die Beladung mit den Antikörpern wurden 150 µl der NeutrAvidin™-modifizierten Nanopartikel (20 mg/ml) mit 500 µl des biotinylierten Antikörpers (25 µg/ml) versetzt und über 90 min bei 10°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden erneut die Partikel durch Zentrifugation und Redispergieren aufgereinigt. Die erhaltenen Partikelüberstände wurden mittels Western-Blot-Analyse auf ungebundenen Antikörper untersucht. Es wurde  
5 konnte gezeigt werden, dass mehr als 80 % des eingesetzten Antikörpers mit dem Partikelsystem verbunden vorlagen.

Mit Hilfe des beschriebenen Partikelsystems wurden in verschiedenen Zellkulturversuchen zellspezifische  
10 Partikelanreicherungen in Zielzellen gefunden, die das vom Antikörper erkannte Oberflächenantigen tragen. Die nachfolgenden Zellkulturmodelle wurden eingesetzt:

1. Lymphozytäre Zielzellen (Jurkat T-Zellen) mit dem Oberflächenantigen CD3.  
15 Nanopartikel wurden mit einem biotinylierten anti-CD3-Antikörper beladen.
2. Humane Brustkrebs-Zelllinien (SK-Br-3-, MCF-7-, BT474-Zellen) mit einer Expression des HER2-Oberflächenantigens.  
20 Nanopartikel wurden mit dem zugelassenen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) beladen, der zuvor biotinyliert wurde.

Die kultivierten Zellen wurden mit dem Nanopartikel-System in Konzentrationen zwischen 100 und 1000 µg/ml inkubiert  
25 und nach 4 h Inkubationszeit ungebundene Nanopartikel durch Waschen der Zellen abgetrennt. Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie (FACS) als auch konfokaler Mikroskopie (CLSM) im Hinblick auf Nanopartikel-Aufnahme untersucht.

Für die Untersuchungen zur zellspezifischen Aufnahme der mit dem biotinylierten anti-CD3-Antikörper modifizierten Nanopartikeln in lymphozytären Zellen wurden Jurkat-T-Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen pro Well auf einer 24-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und RPMI-Medium kultiviert. Das Medium wurde mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FCS), 2 % L-Glutamin und 1 % Penicillin / Streptomycin supplementiert. Die mit dem Antikörper modifizierten Nanopartikel wurden in einer Konzentration von 1000 µg/ml mit den Zellen über einen Zeitraum von 4 h inkubiert. Um eine spezifische zelluläre Aufnahme über den T-Zell-Rezeptor zu belegen, wurden unterschiedliche Kontrollexperimente durchgeführt. Einerseits wurden Nanopartikel eingesetzt, die mit unspezifischem IgG-Antikörper anstelle des spezifischen anti-CD3-Antikörpers beladen waren. Weiterhin wurden die Untersuchungen mit Jurkat-T-Zellen durchgeführt, die mit 2,5 µg freiem IgG- oder anti-CD3-Antikörper pro  $1 \times 10^6$  Zellen über 30 min vorinkubiert wurden. Nach diesem Zeitraum wurden die mit dem anti-CD3-Antikörper beladenen Nanopartikel zugegeben. Andererseits wurden Vergleichsuntersuchungen mit MCF-7-Zellen durchgeführt, die das CD3-Oberflächenantigen nicht aufweisen. Die zelluläre Aufnahme wurde qualitativ mittels konfokaler Mikroskopie sowie quantitativ mittels Durchflusszytometrie bewertet.

Für die Untersuchungen zur zellspezifischen Aufnahme der mit dem biotinylierten anti-HER2-Antikörper modifizierten Nanopartikeln in Brustkrebszellen wurden HER2 überexpremierende Zellen (BT474 und SK-Br-3) in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  bzw.  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well auf einer 24-Well-

Mikrotiterplatte ausgesät und in RPMI-Medium bzw. McCoy's 5 A kultiviert. Das Medium der BT474 wurde mit 20 % (v/v) fötalem Kälberserum (FCS), 2 % L-Glutamin, 1 % Penicillin / Streptomycin und 100 U Insulin supplementiert.

5 Das Medium der SK-Br-3 wurde mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FCS), 2 % L-Glutamin und 1 %

Penicillin / Streptomycin supplementiert. Die mit dem Antikörper modifizierten Nanopartikel wurden in einer Konzentration von 100 µg/ml mit den Zellen über einen

10 Zeitraum von 3 h inkubiert. Um eine spezifische zelluläre Aufnahme über den HER2-Rezeptor zu belegen, wurden unterschiedliche Vergleichsuntersuchungen durchgeführt.

Einerseits wurden Nanopartikel eingesetzt, die mit keinem spezifischem Antikörper beladen waren. Andererseits wurden

15 die Untersuchungen mit MCF-7-Zellen (normale HER2 Expression) durchgeführt. Weiterhin wurden

Kontrollexperimente mit SK-Br-3-Zellen durchgeführt, die mit 2,5 µg/ml freiem anti-HER2-Antikörper (Trastuzumab) pro  $2 \times 10^5$  Zellen über 30 min vorinkubiert wurden. Nach diesem

20 Zeitraum wurden die mit dem anti-HER2-Antikörper beladenen Nanopartikel zugegeben. Die zelluläre Aufnahme wurde qualitativ mittels konfokaler Mikroskopie sowie quantitativ mittels Durchflussszytometrie bewertet.

## 25 Ergebnisse

### *Lymphozytäre Zielzellen (Jurkat T-Zellen)*

Sowohl durch FACS als auch CLSM konnte gezeigt werden, dass Nanopartikel zellulär aufgenommen werden, die mit dem zellspezifischen anti-CD3-Antikörper modifiziert eingesetzt

30 wurden. Die zelluläre Aufnahme konnte verhindert werden, wenn die Zellen vor der Partikelzugabe mit dem freien

spezifischen Antikörper behandelt wurden. Eine Vorbehandlung mit freiem unspezifischem IgG-Antikörper hingegen zeigte keinen Einfluss auf die Partikelaufnahme. Eine Modifikation der Nanopartikel mit einem unspezifischen IgG-Antikörper anstelle des spezifischen anti-CD3-Antikörpers führte gleichfalls zu keiner Aufnahme in den Zielzellen. Kontrollexperimente wurden weiterhin mit Brustkrebszellen (MCF-7-Zellen) durchgeführt, die das CD3-Oberflächenantigen nicht aufweisen. Bei diesen Kontrollexperimenten wurde unter allen gewählten Bedingungen keine Aufnahme der Nanopartikel-Zubereitungen beobachtet.

*Humane Brustkrebs-Zelllinien (SK-Br-3-, MCF-7-, BT474-Zellen)*

Die eingesetzten Zellen zeigten in unterschiedlichem Maße eine Expression des HER2-Oberflächenantigens, das als Angriffspunkt für eine zelluläre Aufnahme der Antikörper-modifizierten Nanopartikel eingesetzt wurde. Die Expression der Zellen wurde vor der Inkubation mit den Nanopartikeln durch Western-Blot-Analyse bestimmt (Tabelle 1).

Zelllinie	Expression HER2
	[%]
BT474	311
MCF-7	100
SK-Br-3	366

Tabelle 1: Expression des HER2-Oberflächenantigens auf der Oberfläche verschiedener Tumorzellen ermittelt durch Western-Blot-Analyse. Die Expression wurde relativ zu den Werten der „normal exprimierenden“ MCF-7-Zellen berechnet.



Sowohl durch FACS als auch CLSM konnte gezeigt werden, dass Nanopartikel zellulär aufgenommen wurden, die mit dem zellspezifischen Antikörper Trastuzumab modifiziert eingesetzt wurden (Figur 2). Die zelluläre Aufnahme der spezifischen Nanopartikel konnte verhindert werden, wenn die Zellen vor der Partikelzugabe mit dem freien spezifischen Antikörper behandelt wurden. Nanopartikel des gleichen Herstellungsansatzes, die nicht mit dem biotinyliertem Antikörper modifiziert eingesetzt wurden, zeigten unter den gewählten Bedingungen eine nur geringe zelluläre Anreicherung. Das Ausmaß der zellulären Aufnahme der Antikörper-modifizierten Nanopartikel konnte mit dem Ausmaß der Expression des HER2-Oberflächenantigens korreliert werden.

Die Ergebnisse der vorgenannten Zellkulturuntersuchungen zeigen deutlich, dass Antikörper-modifizierte Nanopartikel auf Basis von Gelatine eine spezifische Aufnahme in Zielzellen ermöglichen. Unter vergleichbaren Bedingungen werden die Partikelsysteme nur in die entsprechenden Zielzellen aber nicht von Kontrollzellen aufgenommen. Die Vorinkubationen mit freiem spezifischen Antikörper belegen deutlich, dass die Partikelaufnahme durch einen Prozess der Rezeptor-vermittelten Endozytose erfolgt. Somit besteht durch das entwickelte nanopartikuläre Arzneistoffträger-system die Möglichkeit, Arzneistoffe spezifisch zu erkrankten Zellen zu transportieren, sofern sich diese Zielzellen in ihren Oberflächeneigenschaften von gesunden Zellen unterscheiden.

Mit den erfindungsgemäßen Antikörper-modifizierten Nanopartikeln auf Basis von Gelatine wird ein gut charakterisiertes, partikuläres Trägersystem bereit gestellt, das mit einem funktionale Drug Targeting-  
5 Liganden, welches es auf seiner Oberfläche trägt, eine zellspezifische Aufnahme und Anreicherung, auch von gegebenenfalls an das Trägersystem durch Adsorption, Inkorporation oder durch kovalente oder komplexierende Bindung gebundene pharmazeutisch aktive Wirkstoffe  
10 ermöglicht.

### Ansprüche

1. Trägersystem zur zellspezifischen, intrazellulären Anreicherung zumindest eines pharmakologisch aktiven Wirkstoffs, dadurch gekennzeichnet, dass das Trägersystem in Form von Nanopartikeln auf Proteinbasis, bevorzugt auf Basis von Gelatine und/oder Serumalbumin, besonders bevorzugt auf Basis von humanem Serumalbumin, vorliegt und über reaktive Gruppen gekoppelte Strukturen aufweist, die eine zellspezifische Anlagerung und zelluläre Aufnahme der Nanopartikel ermöglichen.
2. Trägersystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die reaktive Gruppe eine Amino-, Thiol-, Carboxylgruppe oder ein Avidin-Derivat ist.
3. Trägersystem nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die gekoppelte Struktur ein Antikörper ist.
4. Trägersystem nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.
5. Trägersystem nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich einen pharmazeutisch aktiven Wirkstoff umfasst, der durch Adsorption, Inkorporation oder kovalente oder komplexierende Bindung über die reaktiven Gruppen an das Trägersystem gebunden ist.

6. Verwendung eines Trägersystems nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Herstellung eines Arzneimittels zur Anreicherung eines pharmazeutisch aktiven Wirkstoffs an/in spezifischen Zellen.

5

7. Verfahren zur Herstellung eines Trägersystems in Form von Nanopartikeln auf Proteinbasis zur zellspezifischen Anreicherung zumindest eines pharmakologisch aktiven Wirkstoffs, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden

10 Schritte umfasst:

- Desolvatieren einer wässrigen Protein-Lösung,
- Stabilisieren der durch Desolvatation entstandenen Nanopartikel durch Quervernetzung,
- Umsetzen eines Teils der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der stabilisierten Nanopartikel zu reaktiven Thiol-Gruppen,
- kovalentes Anheften funktioneller Proteine, vorzugsweise von Avidin, mittels bifunktionaler Spacermoleküle,
- gegebenenfalls Biotinylierung des Antikörpers,
- Beladen der Avidin-modifizierten Nanopartikel mit biotinyliertem Antikörper,
- Beladen der Avidin-modifizierten Nanopartikel mit biotinyliertem und pharmazeutisch oder biologisch aktiven Wirkstoff.

15

20

25

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteinbasis Gelatine und/oder Serumalbumin, vorzugsweise humanes Serumalbumin ist.

30

9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Desolvatieren durch Rühren und Zugabe eines wassermischbaren Nichtlösungsmittels für Proteine oder durch Aussalzen erfolgt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das wassermischbare Nichtlösungsmittel für Proteine aus der Gruppe ausgewählt wird, die Ethanol, Methanol, Isopropanol, und Aceton umfasst.

5

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass zum Stabilisieren der Nanopartikel thermische Prozesse oder bifunktionale Aldehyde oder Formaldehyd verwendet wird.

10

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass als bifunktionales Aldehyd Glutaraldehyd verwendet wird.

15

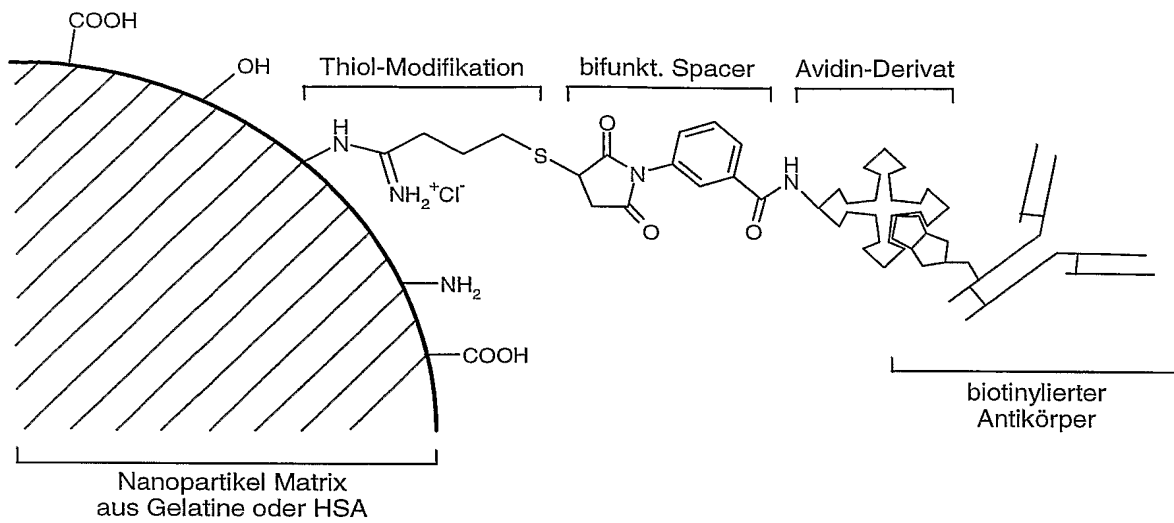
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass als Thiolgruppen-modifizierendes Agens eine Substanz verwendet wird, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die 2-Iminothiolan, eine Kombination aus 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und Cystein, oder eine Kombination aus 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid und Cystaminiumdichlorid sowie Dithiotreitol umfasst.

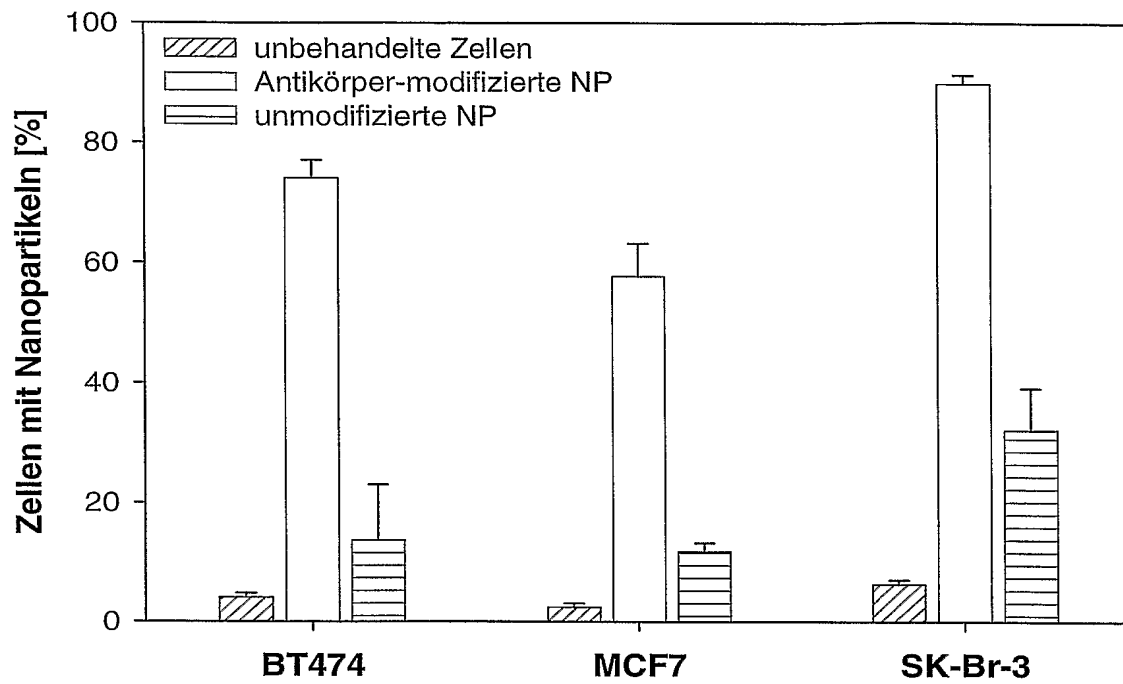
20

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass als bifunktionales Spacermolekül eine Substanz verwendet wird, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfo-succinimidester, Sulfosuccinimidyl-4-[N-maleimido-methyl]cyclohexan-1-carboxylat, Sulfosuccinimidyl-2-[m-azido-o-nitrobenzamido]-ethyl-1,3'-dithiopropionat, Dimethyl-3,3'-dithiobispropionimidat-dihydrochlorid und 3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimidylpropionat] umfasst.

25

30

**FIG. 1**

**FIG. 2**